公裁(4) 開特許 4 (Z (19)日本国物町庁(1 P)

(11)物件出版公司每年

特開平9-157266

(43)公開日 平成9年(1997)6月17日

(51) Int.CI.	ELBIRCH CO.	厅内数理器号	P					技術表示循所
C 0 7 D 303/36			C 0 7 D 303/36	3/36				
A 6 1 K 31/335	ADU		A 6 1 K 31/335	11/335		ADU	5	
	ADZ					ADZ		
C12F 17/02			C12P 17/02	20/1				
# (C 1 2 P 17/02				!				
		報点間分	書金暦次 未開次 開次項の数 5 OL (全 14 頁) 最終頁に続く	10k6	75	4	Ħ	最終頁に說く
(21)出版第号	以四平7 -315542		(71) 出版人 000173913	00017391	_			
				財団法人做生物化学研究会	聚生物	(C#8	47.5	
(22)//(CE)	平成7年(1995)12月4日	A4 B		東京都品川区上大峰3丁月14番23号	IIK F	大麻	THI	4番23号
			(72) 免明者	おか 神経	5			
				未负额品	IIIX A	五成日	36 T	東京都品川区東五良田5丁目1番119 二
				ユーフジマンション701	ゲング	w Z	=	
			(72) 発明者	土田 外志夫	长			
				存款三項	田田田田	市矢面	12 T	中奈川県相段原市矢部2丁目3番24号 ハ
			1	ーモニー矢舗201号	X##20	T.		
			(72) 癸明者	井米				
				東京都台東区入谷2丁目39番地9号	KK Z	B27	H398	B.地9 号

部規抗生物買エポキシキノマイシンAおよびBとその製造技 (54) [9世町の名称]

[(計2] (15)

る抗菌活性および抗腫傷活性を示す新しい分子母格を有 【ARM】 メチシリン耐性的を含むグラム陽性的に対す する抗生物質を提供する。

(BEE) -RE (1)

Ξ

エポキシキノマイシンBでは水敷を示す)で扱わされる が所規抗生物質としてアミコラトプシス sp. WK299-95F 4 代の培養により切られた。エポキシキノマイシンA お よびB、あるいはそれらの指は各種の田田に対する抗菌 エポキシキノマイシンA ねよびエポキシキノマイシンB (式中、RはエポキシキノマイシンAでは塩素を示し、 **活性と抗腫療活性とを育する抗生物質である。**

【精水理1】 次の一般式(1) 【特許胡求の範囲】

θ

(式中、RはエポキシキノマイシンAでは塩素原子を示 で表わされる化合物である抗生物質エポキシキノマイシ し、またエポキシキノマイシンBでは水素原子を示す) ンAおよびエポキシキノマイシンB、またはそれらの

[0004]

٤ に記載のエポキシキノマイシンAおよびBの生産菌を栄 **虹エポキシキノマイシンA ねよび(または)エポキシキ** 集倍地に培養し、培養物かのエボキシキノマイシンA お よび(または)Bを採取することを特徴とする、抗生物 【創水明2】 アミコラトプシス階に属する、鶴水斑」

(または) エポキシキノマイシンB、またはそれらの塩 【請求項3】 抗生物質エポキシキノマイシンAおよび を有効成分とする抗菌剤。 ノレイツンBの製造紙。

【精求項4】 - 抗生物質エポキシキノマイシンA および (または) エポキシキノマイシンB、またはそれらの塩 を有効成分とする抗闘協制。

最終頁に较く

(外2名)

(14)代理人 弁理士 八木田 茂

【簡求項5】 | 抗生物質エポキシキノマイシンA および エポキシキノマイシンBを生産する特性を持つアミコラ トプシス sp. MK299-95F4 株。

【発明の詳細な説明】 [0000]

マイシンAねよび (または) エポキシキノマイシンBの 【発明の属する技術分野】本発明は、抗働活性及び抗腫 マイシン(Epoxyquinomicin) Aおよびエボキシキノマイ 製造法に関する。さらに本発明は、エポキシキノマイシ ンAおよび (または) エポキシキノマイシンBまたはそ る。また、本発明は新規抗生物質エポキシキノマイシン A および B を生産する特性を持つ新規な微生物としての 傷活性または抗傷活性を示す新規抗生物質エポキシキノ シンB、あるいはこれらの協に関し、またエポキシキノ れらの塩を有効成分とする抗菌剤及び抗腫瘍剤に関す アミコラトプシス sp. NK299-95F4 株を包含する。

【従来の技術】種々な多数の抗菌性物質が知られてお り、また種々な多数の抗腫瘍性物質が知られている。

町られているまたは使用されている既知の抗菌性化合物 so [発明が解決しようとする課題] 細菌感染症の化学療法 において、多剤耐性菌の出現は重大な問題である。従来

とは、異なる化学構造を有し且つ優れた抗菌活性を示す 析しい化合物の発見または創製をすることは常に留まれ ており、そのための研究が行われている。また抗腫瘍性 物質は、一般に強い尊性を有するものが多く、その抗腫 そこで、尊性が低く且つ新規な化学構造を有する抗腫病 協利としての使用に当たって大きな制約となっている。 性物質を発見または創製することが常に窒まれており、 そのための研究が行われている。

特周平9-157266

62

【麒園を解決するための手段】本発明有らは、上記の要 望に応えることができる抗菌活性及び抗腫病活性を持つ 新規な抗生物質を提供することを目的に、従来より有用 な抗生物質の開発と英用化の研究を促進してきた。その ス属に属する箇株を分離することに成功し、またこの箇 をふくむグラム陽性の細菌に抗菌活性を示し、また癌細 **結果、土壌試料から新規な改生物としてアミコサトプシ** いることを見い出した。これら新規抗生物質2種を単離 およびエポキシキノマイシンBと命名した。 見に、これ 【0005】すなわち、第1の本発明においては、次の 株が新しい構造骨格を有する複数の抗生物質を生産して することに成功し、それぞれにエボキシキノマイシンA 5の新規抗生物質が薬剤耐性菌(メチンリン耐性菌等) 間の増殖に対して抑制活性を示すことを見い出した。 -- (二) ::

(式中、RはエポキシキノマイシンAでは塩素原子を示 で扱わされる化合物であるエポキシキノマイシンA およ びエポキシキノマイシン8、あるいはこれらの塩が提供 し、またエポキシキノマイシンBでは水蛭原子を示す)

【0006】エポキシキノマイシンAおよびBは、弱性 住物質であり、それらの協としては、第4級アンモニウ 【0001】次に、抗生物質エポキシキノマイシンA お 例えばナトリウムのようなアルカリ金属との塩があり、 ム塩などの有徴塩基との塩、あるいは各種金属との塩、 これらの塩も上記の抗菌活性と抗腫瘍活性を育する。

(1) エポキシキノマイシンAの理化学的性状 よびBの理化学的性状を配載する。

A) 外限及び性質:淡黄色粉体、弱酸性物質

8) 融点: 168-173℃ (分析)

C) 比較光度: (a) o 2 + 44 6° (c 0 51. メラン

D) TLCのRIM: 0.28

シリカゲル (Art.105715、メルク社製) の前周クロマト

BEST AVAILABLE COPY

E) マススペクトル (m/z) :324, 326 (M+H)・

322, 324 (M-H) ·

F) 高分解館マススペクトル: 実験値 322.0136 (MーH)・

(1) メタノール冶液中で固定したDV吸収スペクトル

v max(cm.1) 3450, 1710, 1670, 1600, 1520, 1460, 1 J)" C-NMRスペクトル (CD10D/TMS):商 K) 1H-NMRスペクトル (CD10D/TMS):路 【0008】(2) エポキシキノマイシンBの理化学的性

の図4に示す。

C)分子式:Cii Hia NOa C I H) 供外額吸収スペク

計算值 322.0118

340, 1230

は節片図画の図しに示す。井なパークは次のとおりであ

4 max 148 (£) 236(sh, 8900), 255(sh, 5900), 325(80 Aコピーの10.01N NaOIIーンやメーIVON NIO.0 (11) 00), 370 (sh. 2700)

付図面の図6に示す。 付図画の図5に示す。

> **県収えペクトルは部付数圏の図2に示す。出なパークは** A max sum (c) 234(sh, 11600), 257(sh, 5100), 327(8 状のとおりてある。

(111) 0.01N HC1ーメタノール部法中で資産したUV吸 収スペクトルは低付図面の図3に示す。主なピークは次 300), 371 (sh. 4400)

C) 比枕光度: (a) 🕫 + 32.2° (c 0.51, メタノ

A) 外観及び性質:改賞色粉体,弱酸性物質

B) 融点: 178-184°C (分解)

シリカゲル (Art.105715, メルク社製) の疎磨クロマト ゲラフィーで展開俗媒 としてクロロホルムーメタノール

D) TLCのRf値:0.52

<u>1</u>

ABAX IB (C) 253(6700), 322(8500)

のとおりである。

(10:1) で展開して選択した場合 E) マススペクトル (m/z) : 289 (M)・ 1) 赤外線吸収スペクトル(K B r 錠剤法):溶付図画

· (H-W) 882

290,0664

F) 祐分解昭マススペクトル: 実験値 290.0656 (M+H)・ 計算值

vmex(cm⁻¹) 3430, 1710, 1660, 1610, 1530, 1340, 1 の図10に示す。 230 (I) メルノード 海浜中で 豊原 した IN 吸収 スペケドド

11) 税外額吸収スペクトル: G) 公子共: C14 H11 NO4

を節付図園の図7に示す。 土なピークは次のとおりであ

(II) 0.01N NaOIIーメンノードが済中で直角した扱う スペクトルは低付図面の図8に示す。 土なピークは次の

A max im (€) 237(6100), 253(sh, 5400), 326(6300)

J) " C-NMRスペクトル (CD,OD/TMS) :路 K) 'H-NMRスペクトル (CD10D/TMS):路 付図面の図川に示す。 付図面の図12に示す。 8

【0009】さらに、抗生物質エポキシキノマイシンA およびBの生物学的性状を次に配載する。

(0010) A) 抗菌活体

の普通栄養寒天板上での各種細菌に対する軽低発育阻止 本発明による抗生物質エポキシキノマイシンAねよびB トルは日本化学療徒学会標準法に基ずき、ミュラーヒン 濃度は、次の表!にしめす通りである。この抗菌スペク トン華天培地で倍数希釈法により測定した。

A Bux im (c) 252(5700), 327(6500) 1)赤外縁吸収スペクトル(K B r 駐剤法):部付図面

1111 0.01 N HCI — メタノール協議中で資産したロVス ペクトルは孫は欧田の図9に示す。 出など一クは次のと

lmax rm (£) 235(9100), 259(sh, 4000), 324(5800)

376(sh, 3400) とおりである。

マイツンB 最低発育阻止遺贬 (48/ml) エポキシキノ エポキシキノ 0.25 12.5 12.5 12.5 12.5 g 12.5 12.5 ĸ 13 13 ĸ 8 8 8 120 9 200 マイシン A 3.12 12.5 22 ß 2 ស ស 5 5 5 5 スタヒロコッカス・アウレウス LIRSA Na.5 スタヒロコッカス・Tウレウス MS 16526 スタヒロコッカス・アウレウス TY-04282 スタヒロコッカス・アウレウス FDA 209P スタヒロコッカス・アウレウス・スミス スタヒロコッカス・アウレウス ILS 9610 ミクロコッカス・ルテウス IFO 3333 ミクロコッカス・ルデウス FDA 16 パシルス・サブチリス NRRL 8-558 コリネバクテリウム・ポピス 1810 ンゲラ・デイセンテリエ JS 11910 Œ パシルス・セレウス ATCC 10702 シウドモナス・エルギノサ A3 パストレラ・ピシング sp. 8395 パストレラ・ピシング sp. 0356 パストレラ・ビシンダロー3347 エシェリヒア・コリ 路 1186 エシェリヒア・コリ 配 1121 エシェリヒア・コリ NiHJ パシルス・アンスラシス í. 15

各種の癌細胞を用いて癌細胞の増溜を50%抑制するエボ キシキノマイシンA およびエポキシキノマイシンBの譲 【0012】B) 協植物増落控制活性

al Methods] 65巻, 55—60頁(1983)参照) で倒定した。 その結果を表2に示す。

度(ICso値)を、MTT法(「Journal of Jemunologic (安2)

	1 C so (mg/ml)	(m/87
宋 冥 啓 苗 窗	エポキシキノ	エポキシキノ エポキシキノ
	7177A	マイシンA マイシンB
マウス白血病 L1200	2.64	16,3
マウス IMCカルシノーマ	9.87	17.9
マウスザルコーマ S180	79.7	
マウス黒色煙 B16-BL6	7.97	

【0014】 費1の結果から明らかなように、本籍明に よる抗生物質エポキシキノマイシンAおよびBは、各種 の細菌に対して抗菌活性を有するから抗菌剤として有用

8

である。また、我2の結果から明らかなように、エボキシキノマイシンA およびBは各種の協細糖の増殖を印制 する抗腫瘍活性または抗癌活性を有するから抗腫瘍剤ま 8

3

特閒平9-157266

(五二)

【のの15】さらに知るの本籍明によれば、アミコサトプシス属に関する、創配の一般式(1)のエボキシャンマイシンなみど80位配を代集日他に協乗し、指導がらエボキシャンマイシンもなど(または)エボキケ・ファインン8を採取することを特徴とする、抗生物質エボキシキノマイシン8枚長(または)エボキシキノマイシン8の製造法が増供される。

(0016)知2の本税明の方在で使用できるエボキンキノマイシンAおよびBの生産館の一例としては、アミコラトプシス ap. MK39.55F 株がある。この監検は平成ら10月、収益中10月、電車地位と単紀発行において、記域原仙台市の土場より分離された機関的で、MK39.95Fの箇株市の付された廃生物である。

【0017】このMK299-95F4株の歯学的性状を次に配置

13.0

為生団所はよく分歧し、ジクザグ状を国する。また分断が膨がられる。気色系は四状あるいは不規則な曲状で、円断げ一根円形の断片または配子種の構造に分断する。その数面は不多の対してる。その数面は不多な、大きさは約の.4~0.6×1.1~1.0ミクロンである。種生状、原来が、配子のう及び運動性指さられない。

(0018) 2. 各種母地における生身状態 色の記載について () 内に示す課事は、コンティナー・コーボレーション・エイ・アメリカのカリー・ハーキー・マニコンサ (Container Corporation of America Oction Intrasury manual) を用いた。 (1) シュクロース・総数価等天倍地(27℃倍差)

無色の発育上に、白の気菌系をうっすらと着生し、溶解性色素は認められない。 (3) グルコース・アスパラギン拳天体地(27℃16種)

きず筒(2 ca. Lt Wheat~2 gc. Baaboo)の発育上に、 白の気団糸を哲生し、溶解性色素は質を帯びる。 (3) グリセリン・アスパラギン寮天培地(ISP → 培培 5、27℃倍単)

均量) 開色の発育上に、白の気間糸をうっすらと輩生し、冷解性

27℃信息) うず質術(21g. Mustard Tan) ―仮は質楽(31g. Ad Ad Blown) の発作上に、白の気質糸を想生し、溶解性 色質は子質器を見する。

(6) 供養な天房地 (27℃)的像) きず頃 (2-ca, Lt Wheat) の発力上に、白の気間糸をき

っすらと質生し、溶解性色素は肥められない。

)イースト・麦芽寒天培地(ISP-培地2、27℃培

うす資券 [31c, It Amber] の発育上に、白の気息糸をうっすらと着生し、铬腐性色素は認められない。 りっすらと着生し、铬腐性色素は認められない。 (8) オートミール多天培地(1.5 P −倍地3、27℃倍 無色~うす質(1 1/2ca. Gream)の発育上に、白の気 箇糸をうっすらと着生し、耐解性色質は認められない。 (9) スターチ撃天は地(27℃は豊) 無色の発育上に、白の気菌糸をうっすらと着生し、溶解性

色素は認められない。 (10) リンゴ酸石灰孝天佑地(27℃祐貴) 南色の発育上に、白の気菌糸をうっすらと着生し、治解性 色素は認められない。

[0020] 3. 生理的性質

(1) 生育温度範囲

グルコース・アスパラギン摩天皓地(グルコース 1.0 %、 Lーアスパラギンの 05%、リン酸水煮ニカリウム 0.05%、 しを表す、3.0%、phr. 30 を用い、10で、20 ℃、24℃、27℃、30で、31℃もよど50での各個座で起始 した結果、10℃、50ででの生料は起められず、20℃-21秒 じの範囲で生年した。生育至準温度は21℃は近と思われ

(2) スターチの加水分解(スターチ・細胞塩素天培地、 1.5 P - 培地4及びスターチ等天培地、いずれも27°C培 **) 21日間の位置で、いずれの倍地においても障性である。 (3) メラニン製色素の生成(トリプトン・イースト・ゲロス、1SP-倍地1: ペプトン・イースト・鉄等米倍地、1SP-倍地6: チロシン原天培地、1SP-倍地6: チェッン原天培地、1SP-倍地7:いずれも27℃倍差)

いずれの倍地においても降性である。

[0021] (4) 校典部の利用性 (プリドハム・ゴドリーブ等天命地、ISP-倍地9:27で培養) D-ブルコース、D-フルクトース、イノントール、D-ブルニトル、D-アンニトールを利用して発育し、L-アラピノース、

シュクロース、ラムノース、ラフィノースは利用しない。Dーキシロースの利用の存否は制然としない。(6) リンゴ酸石灰の砂醇(リンゴ酸石灰砂灰砂醇(リンゴ酸石灰砂灰砂酸)27℃

均量後10日目頃よりリンゴ能石灰の冷解が促められ、 その作用は中等度である。

(6) 硝酸塩の還元反応(0.1%硝酸カリウム含有ペプトン水、1 S P 一倍地8、27℃倍量) 倍性である。

【のの22】以上の住状を契約すると、MZ99-95F4株は、その形配上、基生的系はよく分枝し、ジグザク状を呈し、分断を配める。気質系は直状あるいは不規則な曲状で、円面形~長円形の断片または指子様の構造に分断する。輸生域、四声系、加予のう及び運動性指字は認めする。輸生域、四点系、加予のう及び運動性指字は認め

られない。個々の始也で、無色~うす奴~うす奴茶の発育上に日の気傷糸を着生する。一部の指地で俗称性色素は餌あるいは閔茶を祈じる。メラニン球色素の生成。スターチの水解性及び硝酸塩の週元反応はいずれも陰性である

[0023]ところで、WZ89-95F4株の固体成分は、甜問盤にメン型の2、6ープアミノピメリンは、アラピノルスのグラクトースを含み、開始盤ケイバ型を示した。全国体中の固元器はアラピノース、ガラクトースを含わる型であった。また、ミコール様は含有せず、リン部質はPII型(ホスファチンルエタノールアミンを含みボスファチジルンリン及び未知のグルコザミンを含みボスファチジルンリン及び未知のグルコザミンを含みボスファチジルンリンとで表知のグルコ・エ要なメナギーンはMK-9(H・)であった。翻覧様は16:0、1-15:0、16:1, 1-1

の範囲に関節するのが、有利である。

[0024]以上の結果より、版7299-954株はアミコラトプシス(<u>Maycolatopels</u>) 属 (文献: International Lorumal of Systematic Bacteriology 38種、29-37 耳 1986年1に属するものと考えられる。アミコラトプシスの代制の間間を検索すると、アミコラトプシス・スルフレア(<u>Maycolatopels sulphurea</u>) (文献1: 同上: Bacteriology 13種、292-295頁、1895年3月 1997)が、通線の目としてあげられた。そこで、W7290-9574株とアミコラトプシス・スルフレアの当時の変所保度ははと変地には、機能対中である。現時点ではW7299-9574株をアミコラトプシス・エスビー(<u>Amycolatopels sp.</u>) 以729-574とする。なる、W7299-9574株を工具技術院生命工学主模技術研究の工学工具技術研究の工作を含まる。なり574と工具な形に、研究の1997日、香託番号が形にある。なり574と工具ない、W729-1974として受託された。

[0025]類2の本発明の方法を契約するに当っては、アミコラトプシス属に属するエポキシキノマイシン人およびBの生産電を栄養的地に接賃し、この始地中で倍養する。ここて用いる栄養的地は、約配の生産歯が貸代できる炭素が上登業機を栄養の分して含有するもの

【0026】その栄養部としては、適等微生物の栄養部 として適者使用されるもの、例えば状素値、盤素値、類 機関などの同化でさる状態がを使用でする。例えば、が どう様、数す様、常直、デキストリン、グリセリン、顧 おひどの炭化水素や、大豆低、浴に生血などの値間のご と弦炊製価、ならびにペプトン、内エキス、排製形、大 豆砂、酵母エキス、カセイン、コーン・スチーブリカ 一、N2ーアミン、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、値化アンモニウムなどの整累値、さらに保護ニカリ クム、塩化アンモニウムなどの無限塩が使用インを が、塩化アンモニウムなどの無限塩が使用でき、必 即により高価金属例えばコパルトン。 のにより高価金属例えばコパルト、 がにより高価金属例えばコパルト、 がは、地位にマンガンなどの無限塩が使用でき、必 即により高価金属例えばコパルト、

シキノマイシンA および Bを生産するのに使用歯が利用

特刚平9-157266

9

しうるものであればいずれの公知の栄養師でも使用できる。 る。 2。 2) 1 日地における上記のことを供養師の配合的 合は特に削討されるものでなく、広即田に亘って変える ことができ、使用するエポキジキノマインノA およばも 生産節によって、最適の栄養師の組成及び配合的合は、 当等すてあれば簡単な小規模でより容易に決定する にかでき。また、上記の供養師のより容易に決定する にも値に先立ち扱配することができ、この契値の的 は、暗髪に先立ち規密することができ、この契値の的 は、暗髪に先立り担告を一8の範囲、特に耐る5-7、3 [0028]かかる栄養地地でのエボキシキ/マイシンAなよびB生産菌の治療は、一般の効理的による抗生物質の製造において油液使用されている方法に得して行なうことができる。 通常は対気条件下に培養するのが好過であり、機伴しながら及び、又は函数しながら行なってかり、機伴しながら及びとしては静間的量、組とやは単、過数機律をともなう液内は増進のデオれも使用可能であるが、液体は量がエボキシキノマイシンAおよびBの大衛生無に適している。

[0029]使用しうる均衡値度はエポキシキノマイジンイおよび8生産個の発育が取倒的に関きされず、修訂 生物剤を生産しても問題であれば、特に制度されるもの ではなく、使用する生金間におして適宜道料できるが、 特に好ましいのは25~30℃の範囲内の面皮を挙げること ができる。均衡は通常はエポキシキノマイシン人および 8が十分に置するまで角膜することができる。その均 8が十分に置するまで角膜することができる。その均 8が十分に置するまで角膜することができる。その均 8が十分に関するまで角膜することができる。その均 8が上が上間であるまで角膜することができる。その均 6が上が上により関なるが、通常12~12時間の여貨で目的 の所生物質を得ることができる。

【のの3の】培養中の培地内のエボキシキノマイジンAおよびBの路信置はスタヒロコッカス・アウレウス・スミスを使用して、通常の抗生物質の定量に用いられる円筒平板在により定置することができる。

分離した固体からは、適当な有限高線を用いた倍域抽出 法や固体破砕による溶出法により関体から目的の抗生物 時間平9-157266

8

かくして、前記した特性を有する新規抗生物質エポキシ 質を抽出し、上配と同様に単離볅製することができる。 **キノマイシンA ねよびBが得られる。**

で扱されるエボキシキノマイシンAおよび(または)エ 【0032】さらに、知3の本発明では、一般式(1) ポキシキノマイシン Bまたはそれらの製薬学的に非容さ きる塩を有効成分とする抗菌剤が提供される。

(1) で扱されるエポキシキノマイシンA ねよび (また は)エポキシキノマイシンBまたはそれらの製薬学的に 【0033】また、如4の本発明においては、一般式 許容できる塩を弁効成分とする抗腫瘍剤が提供される。

【0034】この抗菌剤または抗腫瘍剤においては、有 は)Bおるいはその協は製薬学的に許容できる常用の固 体または液体担体、例えばエタノール、水、でん粉等と **効成分としてのエポキシキノマイシンA および (また** 間仰されている形の組成物であることができる。

【0035】また、如5の本発明では、新規な微生物と して、前記の一般式(1)のエボキシキノマイシンA お よびBを生殖する特性を持つアミコラトプシス sp. MKZ

99-95F4 株が提供される。 (0036)

【親明の英値の形態】次に英値側により本発明を更に詳 **細に説明するが、本発明は下記の英施例に限定されるも**

のてない。

[0037] <u>製施関1</u> 抗生物質エボキシキノマイシン グリセリン 0.5%、シュークロース 2%、大豆粉 1 A およげ Bの製造

題)を三角フラスコ(500m1容)に 110m1ずつ分注し、# **孫により 120℃で20分減億した。これ5の倍地に、東天** 株 (FERN P-15243) を検信し、その後30℃で5日間回転 8、乾燥群母 1%、コーン・スチーブ・リカー 0.5 **科国培地に培養したアミコラトプシス sp. KK299-95F4** 8、 哲にコパルト 0.001 8 かねむ液体的地(同) 原とう培養した。これにより個母培養液を得た。

で20分域間した。その後、これら頃地に、上記値用培養 液をそれぞれ 2ml ずつ抽傷し、27℃で4日間回転扱とう パクトーンイトン 1%、粉末酵母ゴキス 0.3%、硫酸 ドンモニクム 0.2%、妖骸カルシウム 0.2%、シリコー ノナイル | 街を合む液体指指 (pH7.4に開盤) を川角フラ スコ(500m1谷) に 110m1ずつ分注し、常法により 120℃ 【0038】 グリセリン 2%、デキストリン 2%、

「0039】このようにして得られた培養液を譲過して た。即位アチル国を展出下も通信的国し、残譲をメタン ール20mlに絡かしくキサン20mlな2回流をし、メダノー 団体を分離した。培養ろ液2.55リットルは、6 N一HCl により近2にした後に呼吸ブチル2.55リットルで抽出 し、時間ンチ上面を低水質量ナトリウムにより約数し

い層を展圧下で濃縮乾固した。

-水(50:10:40,100ml)で分配し、下層を減圧下で濃縮 乾団すると、茶色の油状物(0.515g) がほられた。この 1) で順次倍出した。 得られた活性面分を回条件のシリ 順次倍出した。エポキシキノマイシンA およびBの混合 【0040】得られた残渣をクロロホルムーメタノール 油状物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Klesel gel 60、メルク社製、50ml)に付し、トルエンーアセト セトン混合冷煤(50:1. 20:1, 10:1, 7:1)で カゲルカラムクロマトグラフィーに付し、トルエンーブ **物が 124mgほられた。この混合物の35mgをシリカゲルT** LC (展開溶媒:クロロホルムーメタノール, 20:1) ソ協合協議(10:1,7:1,5:1,3:1,2: にかけて分離特製した。

【0041】エポキシキノマイシンAが融点 168~ 173 で(分解)の淡黄色粉末として20mgの収量で得られ、ま たエポキシキノマイシンBが勘点 178~ 184°C(分解) の改質色粉末として10mgの収置で得られた。

【図1】エポキシキノマイシンAのメタノール溶液中の [図面の間単な説明]

【図2】エポキシキノマイシンAの0.01N NaOHーメタ ノール協議中の俄外隷吸収スペクトルである。 就丼齽吸収スペクトルかねる。

【図3】エポキシキノマイシンAの0.01N HCIーメタン ーラ価液中の糖料糖吸収スペクトラかめる。 【図 4】エポキシキノマイシンAのKBr 錠剤法で徴定 した赤外様吸収スペクトルである。

(内部藤番:トリメチラツルン) にて遺伝したプロトン 【図5】 エポキシキノマイシンAの風メタノール溶液 核研究共与スペクトルである。

【図1】エポキシキノマイシンBのメタノール浴液の無 (内部価値:トリメチルシサン) にて河佐した奴驁13核 【図6】 エポキシキノマイシンAの風メタノール溶液 組気共鳴スペクトルである。

【図8】 エポキシキノマイシンBの0.01N NaOHーメタ 【図9】 エポキシキノマイシンBの0.01N HCIーメタン ノール泊液中の銀外類吸収スペクトルである。 外様吸収スペクトルである。

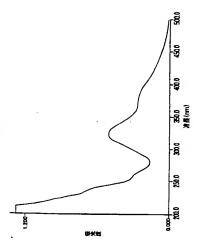
【図10】 エポキシキノマイシンBのK B r 気包符で選 ーラ箔積中の熊外糠吸収スペクトラである。 作した非女類取扱スペケトルである。

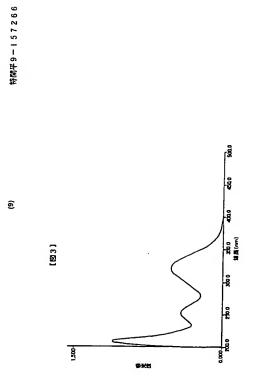
【図11】 エボキシキノマイシンBの重メタノール溶液 (内部環準:トリメチルシラン) にて測定したプロトン 核磁気共鳴スペクトルである。

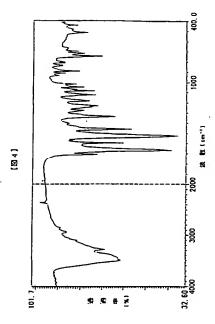
【図12】 エポキシキノマイシンBの瓜メタノール溶液 (内部標準:トリメテルシサン) にて過ぎした状態13核 批気共鳴スペクトルである。

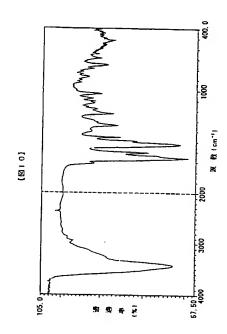
ŝ

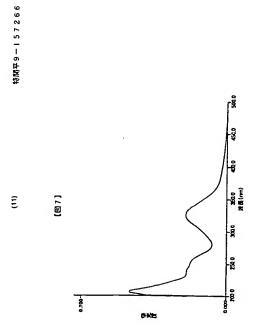
[⊠2]

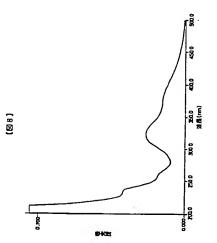










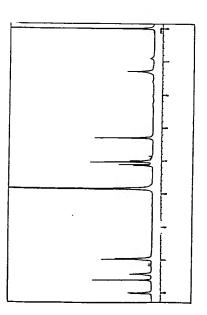


3

(I 🗵

特開平9-157266

[8 | 2]



(手稅補正面)

(現出日) 平成8年4月26日 (手球加圧1) (14正年余世48) 明田世 (14元年8月8月) 0010 (4年7年) 変更

[0010] V) 抗四倍性 [知田中母]

本発明による抗生物質エポキシキノマイシンA およびB の各種部値に対する最低発育阻止調度は、次の表 I にし めす適りである。この抗菌スペクトルは日本化学療法学 食頃単姓に基ずき、ミュラーヒントン等天培地で倍熱箱 所在により刻定した。

[杨正村命四级名] 明细四 【手铣補正2】

【補正対象項目名】0021 【構正方法】変更

【補正内容】

【0021】(4) 政務課の利用性 (プリドハム・ゴドリ

- プ条天郎地、I S P - 培地9:27℃印象) - プルコース、d - フルクトース、イノントール、d - マンニトールを利用して発育し、1 - アプピノース、 シュクロース、ウムノース、ラフィノースは利用しな

陪住である。

レロントページの禁む

庁内整理番号 級別記号 C 1 2 R 1:01)

(51) Int. C1.

Ŀ

神奈川県慎浜市緑区白山4丁目61番17号 (72)発明者 飯沼 東信 (72)発明者 1 力力

神奈川県校瀬市校西四丁目6番7号

<u>\$</u>

特間平9-157266

い、<u>(</u>ーキソロースの利用の存在は判然としない。 (s) リンゴ酸石灰の治解(リンゴ酸石灰素天培地、27℃ 培養) 培養後10日目頃よりリンゴ酸石灰の溶解が認められ、

その作用は中等度である。 (6) 硝酸塩の週元反応(0.1%超酸カリウム含ねペプトン 水、 I S P - 珀地8、27℃角量)

技術投示固所

(72)発明督 長縄 博

東京都大田区田園牌布本町3番17号 常田東 (72)発明者

東京都佐衛区内都町・田地26 別位レジデ ンス405号

NOVEL ANTIBIOTICS EPOXYQUINOMICINS A AND B, AND METHOD FOR PRODUCING THE SAME

__ABSTRACT

PROBLEM

Antibiotics with new molecular skeletons that exhibit antibacterial activity and antitumor activity against Gram-positive bacteria including methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) are provided.

PROBLEM

Epoxyquinomicin A and epoxyquinomicin B, represented by the general formula (I), were obtained as novel antibiotics by culturing Amycolatopsis sp. MK299-95F4.

(wherein R represents chlorine and hydrogen in epoxyquinomicin A and epoxyquinomicin B, respectively) Epoxyquinomicins A and B or their salts are antibiotics with antibacterial activity and antitumor activity against various bacteria.

CLAIMS

1. Epoxyquinomicin A and epoxyquinomicin B, which are compounds represented by the following general formula (I) or their salts,

(wherein R represents chlorine and hydrogen in epoxyquinomicin A and epoxyquinomicin B, respectively).

- 2. A method for producing the antibiotics epoxyquinomicins A and (or) B, comprising the steps of culturing in a nutrient medium a bacterium of the genus Amycolatopsis, which produces epoxyquinomicins A and B of claim 1, and isolating epoxyquinomicins A and (or) B from the resulting culture.
- 3. An antibacterial agent, comprising epoxyquinomicin A and (or) epoxyquinomicin B or their salt(s) as active

ingredient(s).

- 4. An antitumor agent, comprising epoxyquinomicin A and (or) epoxyquinomicin B or their salt(s) as active ingredient(s).
- 5. Amycolatopsis sp. MK299-95F4, which has the property of producing the antibiotics epoxyquinomicin A and epoxyquinomicin B.

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION [0001]

TECHNICAL FIELD

The present invention relates to novel antibiotics epoxyquinomicin A and epoxyquinomicin B with antibacterial activity and antitumor/anticancer activity or their salts, and also to a method for producing epoxyquinomicins A and (or) epoxyquinomicin B. The present invention further relates to antibacterial agents and antitumor agents which contain epoxyquinomicin A and (or) epoxyquinomicin B or their salt as active ingredient(s). In addition, the present invention encompasses Amycolatopsis sp. MK299-95F4, which has the property of producing the antibiotics epoxyquinomicin A and epoxyquinomicin B.

[.0002]

DESCRIPTION OF THE RELATED ART

Large numbers of various antibacterial agents and large numbers of various antitumor substances are known.

[0003]

PROBLEM TO BE SOLVED BY THE INVENTION

The emergence of multidrug-resistant bacteria is a major concern in the chemotherapy of microbism. Discovery and development of new compounds that have different chemical structures from known antibacterial compounds currently used or conventionally known and that exhibit excellent antibacterial activity have always been awaited and thus studies aimed at that scope has been promoted. In general, most antitumor substances have strong toxicity, which poses serious limitations to their use as antitumor agents. Discovery and

development of new compounds that are less toxic with novel chemical structures have always been awaited and thus studies aimed at that scope has been promoted.
[0004]

MEANS FOR SOLVING THE PROBLEMS

The inventors have long promoted the research and developmentof useful antibiotics and their practical use for the purpose of providing novel antibiotics with the antibacterial activity and antitumor activity that can meet the aforementioned request. As a result, we have succeed in isolating a strain of the genus Amycolatopsis as a novel microorganism from soil samples and found the strain produces a plurality of antibiotics with new structural skeletons. We have successfully isolated two new types of novel antibiotics and named each epoxyquinomicin A and epoxyquinomicin B. Further, we have found that these novel antibiotics exhibit antibacterial activity against Gram-positive bacteria including drug-resistant bacteria (methicillin resistant Staphylococcus aureus etc.) suppressive activity on proliferation of cancer cells. [0005] Accordingly, in a first aspect of the present invention, there is provided epoxyquinomicin A and epoxyquinomicin B, which are compounds represented by the following general formula (I) or their salts,

(wherein R represents chlorine and hydrogen in epoxyquinomicin A and epoxyquinomicin B, respectively)

[0006] Epoxyquinomicins A and B are acescent substances. Their salts include salts with organic bases, such as quaternary ammonium salt, or salts with various metals, and salts with alkali metals, such as sodium. These salts also have the aforementioned antibacterial activity and antitumor activity. [0007] Hereinbelow, the physical and chemical properties of the antibiotic epoxyquinomicins A is described.

(1) The physical and chemical properties of the antibiotic epoxyquinomicins A

- A) Appearance and properties: light yellow powder, acescent substance
- B) Melting point: 168-173°C (degradation)
- C) Specific rotation: $[\alpha]_D^{25} + 44.6^{\circ}$ (c 0.51, methanol)
- D) Rf value in TLC: 0.28

When developed on silica gel-coated thin layer chromatography plates (Merck Art 105715) using chloroform/MeOH = 10:1 as a developing solvent

- E) Mass spectrum (m/z): 324,326 $(M+H)^+$ 322,324 $(M-H)^-$
- F) High resolution mass spectrum:

 Experimental value 322.0136 (M-H) Calculated value 322.0118
- G) Molecular formula: $C_{14}H_{10}NO_6$ Cl
- H) Ultraviolet absorption spectra:
- (i) UV absorption spectrum measured in methanol solution is shown in FIG. 1 of the accompanying drawing. The characteristic peaks are as follows:
- $\lambda \max nm$ (ϵ) 236 (sh, 8900), 255 (sh, 5900), 325 (8000), 370(sh, 2700)
- (ii) UV absorption spectrum measured in 0.01N NaOH-methanol solution is shown in FIG. 2 of the accompanying drawing. The following characteristic peaks were observed:
- λ max nm (ϵ) 234(sh, 11600), 257(sh, 5100), 327(8300), 371(sh, 4400)
- (iii) UV absorption spectrum measured in 0.01N NCl-methanol solution is shown in FIG. 3 of the accompanying drawing. The following characteristic peaks were observed:
- $\lambda \max nm (\epsilon) 253(6700), 322(8500)$
- I) Infrared absorption spectrum (the KBr tablet method): shown in FIG.4 of the accompanying drawing.
- v max (cm⁻¹) 3450, 1710, 1670, 1600, 1520, 1460, 1340, 1230
- J) $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum (CD₃OD/TMS): shown in FIG. 5 of the accompanying drawing.
- K) $^{1}\text{H-NMR}$ spectrum (CD $_{3}$ OD/TMS): shown in FIG. 6 of the

accompanying drawing.

- [0008] (2) The physical and chemical properties of the antibiotic epoxyquinomicins B
- A) Appearance and properties: light yellow powder, acescent substance
- B) Melting point: 178-184°C (degradation)
- C) Specific rotation: $[\alpha]_D^{25} + 32.2$ (c 0.51, methanol)
- D) Rf value in TLC: 0.52

When developed on silica gel-coated thin layer chromatography plates (Merck Art 105715) using chloroform/MeOH = 10:1 as a developing solvent

- E) Mass spectrum (m/z): 289 $(M)^+$ 288 $(M-H)^-$
- F) High-resolution mass spectrum:

 Experimental value 290.0656 (M+H) *

 Calculated value 290.0664
- G) Molecular formula: $C_{14}H_{11}NO_6$
- H) Ultraviolet absorption spectra:
- (i) UV absorption spectrum measured in methanol solution is shown in FIG. 7 of the accompanying drawing. The following characteristic peaks can be observed:
- $\lambda \max nm$ (ϵ) 237(6100), 253(sh, 5400), 326(6300),
- (ii) UV absorption spectrum measured in 0.01N NaOH-methanol solution is shown in FIG. 8 of the accompanying drawing. The following characteristic peaks were observed:
- λ max nm (ϵ) 235 (9100), 259 (sh, 4000), 327 (5800), 376 (sh, 3400)
- (iii) UV spectrum measured in 0.01N NCl-methanol solution is shown in FIG. 9 of the accompanying drawing. The following characteristic peaks were observed:
- $\lambda \max nm (\epsilon) 252(5700), 327(6500)$
- I) Infrared absorption spectrum (the KBr tablet method): shown in FIG. 10 of the accompanying drawing.
- ν max (cm⁻¹) 3430, 1710, 1660, 1610, 1530, 1340, 1230

- J) $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum (CD3OD/TMS): shown in FIG. 11 of the accompanying drawing.
- K) $^{1}\text{H-NMR}$ spectrum (CD30D/TMS): shown in FIG. 12 of the accompanying drawing.
- [0009] Further, the biological properties of the antibiotics epoxyquinomicins A and B are described below.

[0010] A) Antibacterial activity

The minimum growth inhibition concentrations of the antibiotics epoxyquinomicins A and B according to the present invention against various bacteria on a normal nutrient agar plate is as shown in Table 1 below. This antibacterial spectrum was obtained by the two-fold dilution method by the Muller-Hinton agar medium according to the standard method recommended by Japanese Society of Chemotherapy.

[0011]

Test microorganisms	Minimum growth inhibition concentration (µg/ml)	
·	epoxyquinomicin A	epoxyquinomicin B
Staphylococcus aureus FDA 209P	12.5	12.5
Staphylococcus aureus Smith	12.5	12.5
Staphylococcus aureus MS 9610	50	25
Staphylococcus aureus MRSA No.5	25	25
Staphylococcus aureus MS 16526	25	25 <u>.</u>
Staphylococcus aureus TY-04282	50	25
Micrococcus luteus FDA-16	12.5	25
Micrococcus luteus IFO 3333	3.12	6.25
Bacillus anthracis	25	12.5
Bacillus subtilis NRRL B-558	50	12.5
Bacillus cereus ATCC 10702	25	12.5
Corynebacterium bovis 1810	50	50
Escherichia coli NIHJ	100	50
Escherichia coli BE 1121	50	50
Escherichia coli BE 1186	50	50
Shigella dysenteriae JS 11910	50	50
Pseudomanas aeruginosa A3	>50	>50
Pasteurella piscicida sp. 6395	12.5	12.5
Pasteurella piscicida sp. 6356	12.5	12.5
Pasteurella piscicida p-3347	3.12	12.5

[0012] B) Suppressive activity on cancer cell proliferation The concentrations of epoxyquinomicin A and epoxyquinomicin B that cause 50% cancer cell death (IC50) were determined using various kinds of cancer cells by the MTT method (refer to "Journal of Immunological Methods," 65, 55-60 (1983)). The results are shown in Table 2.

[0013] Table 2

Test cancer cells	IC ₅₀ (IC ₅₀ (µg/ml)	
	epoxyquinomicin A	epoxyquinomicin B	
Mouse leukemia L1200	2.64	16.3	
Murine carcinoma IMC carcinoma	9.67	17.9	
Murine sarcoma S180	7.67		
Mouse melanoma B16-BL6	7.97		

[0014] As is apparent from the results in Table 1, since the antibiotics epoxyquinomicins A and B according to the present invention have antibacterial activity against various kinds of bacteria, they are useful as antimicrobial agents. Further, as is apparent from the results in Table 2, since epoxyquinomicins A and B have antitumor activity or anti-cancer activity in which proliferation of various kinds of cancer cells are suppressed, they are useful as antitumor agents or anticancer agents.

[0015] Further, according to a second aspect of the present invention, a method is provided for producing the antibiotics epoxyquinomicin A and (or) B, which include the steps of culturing in a nutrient medium a bacterium of the genus Amycolatopsis, which produces epoxyquinomicins A and B of claim 1, and isolating epoxyquinomicins A and (or) B from the resulting culture.

[0016] One example of the epoxyquinomicins A and B-producing bacteria that can be used in a second aspect of the present invention is Amycolatopsis sp. MK299-95F4. This is an actinomycetes strain designed as MK299-95F4, which was isolated by the present inventors from a soil sample collected in Sendai city, Miyagi prefecture, Japan, in October, 1994.

[0017] The microbial properties of MK299-95F4 are as follows:

1. Morphological observation

Substrate hyphae are extensively branched, giving a zigzag appearance. Fragmentation is observed. Aerial hyphae are either straight or irregularly curving, disintegrating into oval- to cylindrical-structures or spore-like structure.

Spores measure about 0.4 to 0.6 μ by 1.1 to 1.6 μ in size and have a smooth surface. Neither verticillate branching nor rhizomorph nor sporangium nor motile spore is observed. [0018] 2. Growth characteristics in various culture media The standard given in each of the brackets for the description of color is according to "Color Harmony Manual" of Container Corporation of America.

- (1) Sucrose-nitrate-agar culture medium (cultured at 27°C) White aerial hyphae are thinly formed on the colorless growth. No soluble pigment is observed.
- (2) Glucose-asparagine-agar medium (cultured at 27°C) White aerial hyphae are formed on pale yellow (2 ea, Lt Wheat-2 gc Bamboo) growth. The soluble pigment is tinged with yellow. (3) Glycerine-aspargine-agar medium (ISP-medium 5, cultured at 27°C)

White aerial hyphae are formed on yellowish brown [3 ie, Camel-31e, and Cinnamon] growth. The soluble pigment is tinged with yellowish brown.

(4) Starch-inorganic salt-agar medium (ISP-medium 4, cultured at 27°C)

White aerial hyphae are thinly formed on the colorless growth. No soluble pigment is observed.

[0019] (5) Tyrosine-agar medium (ISP-medium 7, cultured at 27° C) $^{\circ}$

White aerial hyphae are formed on the growth of yellowish brown [21g, Mustard Tan] to grayish yellow brown [31g Adobe Brown]. Soluble pigment of pale yellow color is observed.

- (6) Nutrient agar medium (cultured at 27°C) White aerial hyphae are thinly formed on pale yellow [2ea Lt Wheat] growth. No soluble pigment is observed.
- (7) Yeast-malt agar medium (ISP-medium 2, cultured at 27°C) White aerial hyphae are thinly formed on the pale yellowish brown [3ic Amber] growth. No soluble pigment is observed.
- (8) Oatmeal agar medium (ISP-medium 3, cultured at 27 °C) White aerial hyphae are thinly formed on the growth of colorless to pale yellow [11/2ca Cream]. No soluble pigment is observed.

- (9) Starch agar medium (cultured at 27°C) White aerial hyphae are thinly formed on the colorless growth. No soluble pigment is observed.
- (10) Calcium malate-agar medium (cultured at 27°C) White aerial hyphae are thinly formed on the colorless growth. No soluble pigment is observed.

[0020] 3. Physiological properties

- (1) Temperature range for growth
- In the tests conducted using a glucose-asparagine-agar medium (1.0% glucose, 0.05% L-asparagine, 0.05% dipotassium hydrogenphosphate, 3.0% strip agar, pH 7.0) at different temperatures of 10°C, 20°C, 24°C, 27°C, 30°C, 37°C, and 50°C, the MK299-95F4 strain grew at all temperatures tested except 10° C and 50° C. Optimum temperature for good growth appears to be in the vicinity of 27°C.
- (2) Hydrolysis of starch (starch-inorganic salt agar medium, ISP-medium 4; and starch-agar medium, each cultured at 27°C) As a result of 21-day culture, hydrolysis of starch was negative in both the media.
- (3) Formation of melanoid pigment (Trypton-yeast broth, ISP-medium 1; peptone-yeast-iron agar medium, ISP-medium 6; tyrosine-agar medium, ISP-medium 7; each cultured at 27°C) Formation of melanoid pigment was negative in all the media. [0021] Utilization of various carbon sources (Pridham-Gottlieb agar medium, ISP-medium 9, cultured at 27°C)
- D-glucose, D-fructose, inositol, and D-mannitol were utilizable for the growth, whereas L-arabinose, sucrose, rhamnose, raffinose lactose were not utilizable. Whether or not D-xylose was utilizable was not clear.
- (5) Liquefaction of calcium malate (calcium malate agar medium, cultured at 27°C)
- Liquefaction started at around the tenth day of culture and the effect was moderate.
- (6) Reduction of nitrate (aqueous peptone solution containing 0.1% potassium nitrate, ISP-medium 8, cultured at 27°C)

Reduction of nitrate was negative.

[0022] In summary of the microbiological properties described above, the MK299-95F4 strain is morphologically characterized as follows: Substrate hyphae is extensively branched, giving a zigzag appearance. Fragmentation is observed. Aerial hyphae are either straight or irregularly curving, disintegrating into oval- to cylindrical-structures or spore-like structure. Neither verticillate branching nor rhizomorph nor sporangium nor motile spore is observed. White aerial hyphae are formed on the growth of colorless to pale yellow to pale yellowish brown in various media. Soluble pigment is tinged with yellow or yellowish brown in some media. Formation of melanoid pigment, hydrolysis of starch, and reduction of nitrate are all negative. [0023] The bacterial cell components of the MK299-95F4 strain contain meso-2,6-diaminopimelic acid, arabinose, galactose in the cell walls, exhibiting type IV cell walls. The reducing sugar in all bacterial cells was type A containing arabinose and galactose. As a result of the glycolate test, it was found to be the acetyl type. Moreover, mycolic acid was present, phospholipid type was (phosphatidylethanolamine was present; phosphatidylcholine and an unidentified phospholipid containing glucosamine were not), and main menaquinones were MK-9 (H_4).

As for fatty acid, 16:0, i-15:0, 16:1, and i-16:0 and 17:0 were the main components.

[0024] These results suggest that the MK299-95F4 strain belongs to the genus Amycolatopsis(literature: "International Journal of Systematic Bacteriology," 36, 29-37,1986). Searches of the known Amycolatopsis strains revealed that Amycolatopsis sulphurea is a close relative to the MK299-95F4 strain (literature 1: id. and literature 2: "International Journal of Systematic Bacteriology," 37, 292-295, 1987). Thus, comparative analysis is being performed between the MK299-95F4 strain and the Amycolatopsis sulphurea strains that we have reserved. At present, the MK299-95F4 strain is identified as "Amycolatopsis sp. MK299-95F4". The MK299-95F4 strain was

deposited at the National Institute of Bioscience and Human-Technology under the accession number FERM P-15243 in October 17, 1995.

[0025] In implementation of the method of a second aspect of the present invention, the epoxyquinomicins A and B-producing bacterium of the genus Amycolatopsis is inoculated into a nutrient medium, in which the bacterium is cultured. The nutrition medium used here contains a carbon source and nitrogen source that above-mentioned producing bacterium can utilize as nutritive components.

[0026] As the nutrient sources, those typically used as nutrient sources for microorganisms, which are assimilabe nutrients such as carbon sources, nitrogen sources, inorganic salts, etc., can be used. The carbon sources usable include hydrocarbons (e.g., grape sugar, malt sugar, molasses, dextrin, glycerin, and starch) and fats and oils (e.g., soybean oil and peanut oil). The nitrogen sources usable include peptone, meat extract, cotton seed powder, soybean flour, yeast extract, casein, corn steep liquor, NZ-amine, ammonium sulfate, ammonium nitrate, and ammonium chloride. The inorganic salts usable include dipotassium phosphate, sodium phosphate, salt, calcium carbonate, magnesium sulfate, manganese chloride, etc. these amounts, trace metals, for example, cobalt, iron, etc., can be added if necessary. Further, any other known nutrient source can be used as long as it is useful for the bacteria in producing the antibiotics epoxyquinomicins A and B.

[0027] The percentage of the aforementioned nutrient sources in media is not limited; it can vary widely. The optimal composition and percentage of epoxyquinomicins A and B can easily be determined by those skilled in the art, depending on the epoxyquinomicins A and B-producing bacterium, by performing simple, small-scale experiments. Moreover, the nutrient media composed of the aforementioned nutrient sources can be sterilized in advance of culture. It is advantageous to adjust pH of the medium in the range of 6-8, particularly 6.5-7.5 before or after the sterilization.

[0028] The epoxyquinomicins A and B-producing bacteria can be cultured in such nutrient media according to the methods typically used in the production of antibiotics using common actinomycetes. Usually, culture under aerobic conditions is suitable and it can be performed while stirring and/or aerating. Culture methods that can be used include stationary culture, shaking culture, and submerged culture accompanied by aeration and stirring, but liquid culture is suitable for mass production of epoxyquinomicins A and B.

[0029] Culture temperature that can be used is not limited as long as it is in the range where the growth of the epoxyquinomicins A and B-producing bacterium is not substantially inhibited but is capable of producing the antibiotics. Culture temperature can thus be selected depending on the producing bacteria used, but temperatures in the range of 25°C to 30°C are the most preferable. Culture can usually continued until an adequate amount of epoxyquinomicins A and B has been accumulated. Although the culture duration varies with the composition of the medium, culture temperature, temperature for use, the bacterial strain to be used, etc., but typically, the target antibiotics can be obtained by culturing for 72 to 120 hours.

[0030] The amount of epoxyquinomicins A and B accumulation in medium during culture can be quantified by using Staphylococcus aureus Smith by the cylinder plate method, a method typically used for quantification of antibiotics.

[0031] Epoxyquinomicins A and B thus accumulated in the culture are isolated from the culture in the following manner. After removing bacterial cells from culture by the isolation methods known themselves, such as filtration and centrifugation, if necessary, following culture, the culture filtrate is adjusted to acidity (pH 2-4). The target antibiotics can be recovered through isolation and purification by using solvent extraction with organic solvents, particularly ethyl acetate, etc., adsorption and ion-exchange chromatography, or gel filtration and countercurrent distribution chromatography independently

or in combination. As carriers for adsorption and ion-exchange chromatography, activated charcoal, silica gel, porous polystyrene-divinylbenzene resin, or various kinds of ion exchange resin can be used. In addition, from the isolated bacterial cells, target antibiotics can be extracted, and isolated and purified by solvent extraction using a suitable organic solvent or elution method by bacterial cell disruption in the same manner described above. The novel antibiotics epoxyquinomicins A and B with the above-described properties are thus obtained.

[0032] Further, in a third aspect of the present invention, there is provided an antibacterial agent that contains epoxyquinomicins A and (or) epoxyquinomicin B, represented by the general formula (I), or their pharmaceutically acceptable salt(s) as active ingredient(s).

[0033] Further, in a fourth aspect of the present invention, there is provided an antitumor agent that contains epoxyquinomicins A and (or) epoxyquinomicin B, represented by the general formula (I), or their pharmaceutically acceptable salt(s) as active ingredient(s).

[0034] In this antibacterial agent or antitumor agent, epoxyquinomicins A and (or) B or their (its) salt(s) as active ingredient(s) can be a composition mixed with pharmaceutically-acceptable solid or a fluid carrier in ordinary use, such as ethanol, water, starch, etc.

[0035] Further, in the fifth aspect of the present invention, there is provided Amycolatopsis sp. MK299-95F4, which has the property of producing the antibiotics epoxyquinomicin A and epoxyquinomicin B represented by the aforementioned general formula (I).

[0036]

DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

The present invention will be more specifically described by giving examples hereinbelow. However, the scope of the present invention is not limited to these examples.

[0037]

EXAMPLE 1

Production of the antibiotics epoxyquinomicins ${\tt A}$ and ${\tt B}$ A liquid medium (pH 7.0) containing 0.5% glycerin, 2% sucrose, 1% soybean flour, 1% dry yeast, 0.5% corn steep liquor, 0.001% cobalt chloride was placed (110 ml each) in 500 ml Erlenmeyer flasks, and sterilized at 120°C for 20 min by the conventional method. Subsequently, Amycolatopsis MK299-95F4 (FERM P-15243) was taken from its agar slant culture and then inoculated into the aforementioned medium, followed by shaking culture at 30°C for 5 days to obtain a seed culture. [0038] A liquid medium (pH 7.4) containing 2% glycerin, 2% dextrin, 1% Bacto Soyton, 0.3% powder yeast extract, 0.2% ammonium sulfates, 0.2% calcium carbonate, and one drop of silicone oil was placed (110 ml each) in 500 ml Erlenmeyer flasks, and sterilized at 120°C for 20 min by the conventional method. 2 ml portions of the aforementioned seed culture were inoculated into these media, followed by shaking culture at 27°C $\,$ for 4 days.

[0039] The resulting culture was filtered to isolate bacterial cells. 2.55 l of the recovered culture filtrate was adjusted to pH 2 with 6N-HCl and then extracted by an equal volume of butyl acetate. The butyl acetate layer was dried with anhydrous sodium sulfate. The butyl acetate was concentrated to dryness under reduced pressure. The residue was dissolved in 50 ml of methanol, washed twice with 5 ml of hexane, and the methanol layer was concentrate to dryness under reduced pressure.

[0040] The resulting residue was separated by chloroform-methanol-water (50:10:40, 100 ml) and the lower layer was concentrated to dryness under reduced pressure to yield a brown oily substance (0.515 g). This oily substance was subjected to silica gel column chromatography (Kieselgel 60, Merck Co., 50 ml) and sequentially eluted with a toluene-acetone mixed solvent (10:1, 7:1, 5:1, 3:1, and 2:1). The resulting active fractions were subjected to silica gel column chromatography under the same conditions and

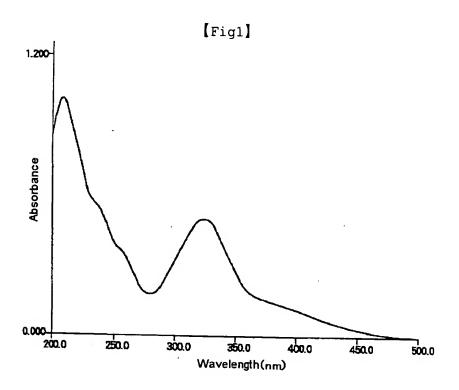
sequentially eluted with a toluene-acetone mixed solvent (50:1, 20:1, 10:1, and 7:1) to afford a 124 mg mixture containing epoxyquinomicins A and B. 35 mg of this mixture was isolated and purified by silica gel TLC (developing solvent:—chloroform-methanol, 20:1).

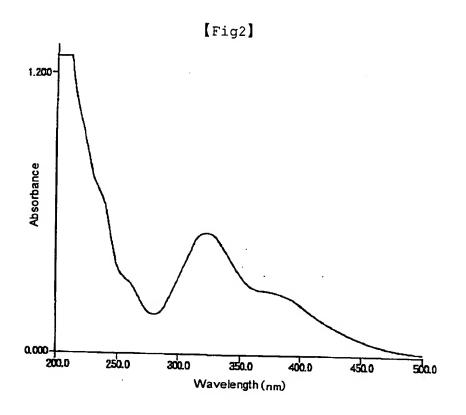
[0041] Epoxyquinomicin A was obtained as a 20 mg light yellow powder with a melting point of 168-173°C (degradation) and epoxyquinomicin B as a 10 mg light yellow powder with a melting point of 178-184°C (degradation).

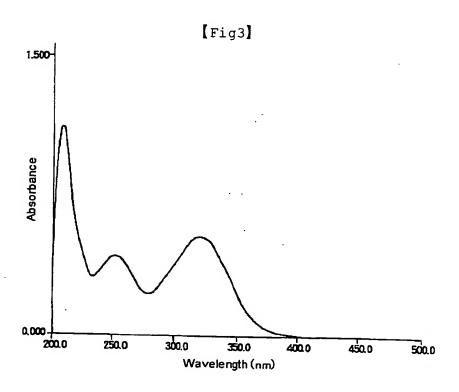
BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

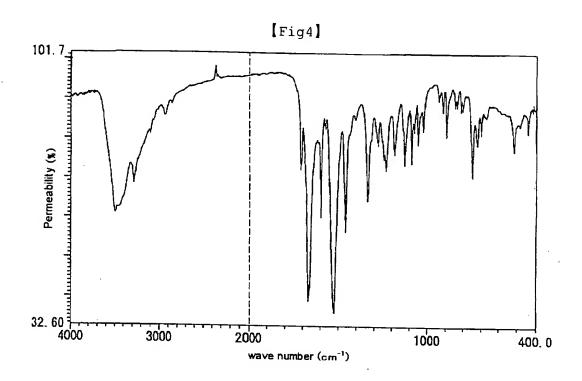
- FIG. 1 shows an ultraviolet absorption spectrum of epoxyquinomicin A in methanol solution.
- FIG. 2 shows an ultraviolet absorption spectrum of epoxyquinomicin A in 0.01N NaOH-methanol solution.
- FIG. 3 shows an ultraviolet absorption spectrum of epoxyquinomicin A in 0.01N HCl-methanol solution.
- FIG. 4 shows an infrared absorption spectrum of epoxyquinomicin A measured by the KBr tablet method.
- FIG. 5 shows a proton nuclear magnetic resonance spectrum of epoxyquinomicin A measured with heavy methanol solution (internal standard: trimethyl silane).
- FIG. 6 shows a carbon-13 nuclear magnetic resonance spectrum of epoxyquinomicin A measured with heavy methanol solution (internal standard: trimethyl silane).
- FIG. 7 shows an ultraviolet absorption spectrum of epoxyquinomicin B in methanol solution.
- FIG. 8 shows an ultraviolet absorption spectrum of epoxyguinomicin B in 0.01N NaOH-methanol solution.
- FIG. 9 shows an ultraviolet absorption spectrum of epoxyquinomicin B in 0.01N HCl-methanol solution.
- FIG. 10 shows an infrared absorption spectrum of epoxyquinomicin B measured by the KBr tablet method.
- FIG. 11 shows a proton nuclear magnetic resonance spectrum of epoxyquinomicin B measured with heavy methanol solution (internal standard: trimethyl silane).

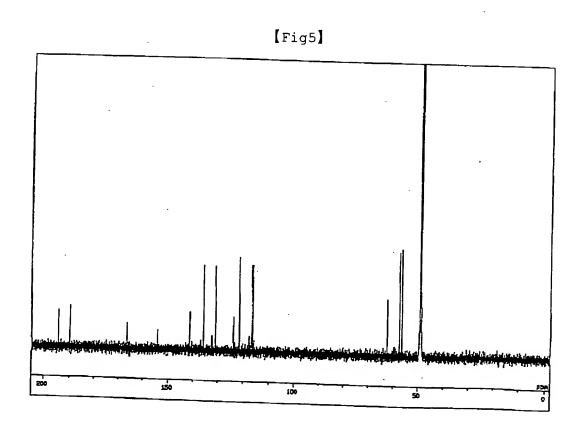
FIG. 12 shows a carbon-13 nuclear magnetic resonance spectrum of epoxyquinomicin B measured with heavy methanol solution (internal standard: trimethyl silane).

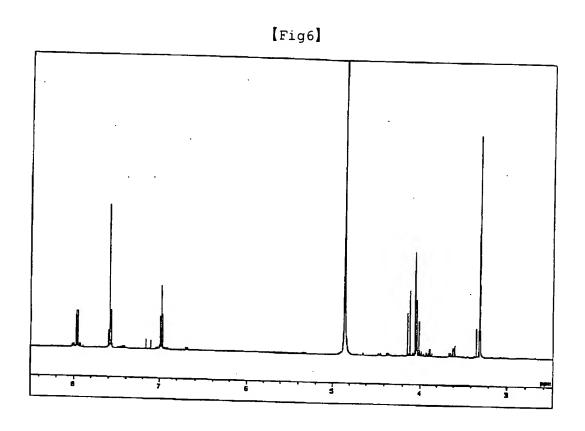


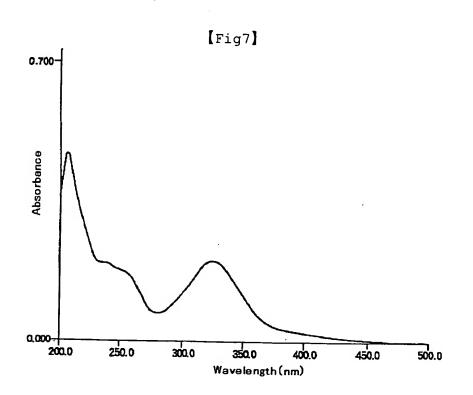


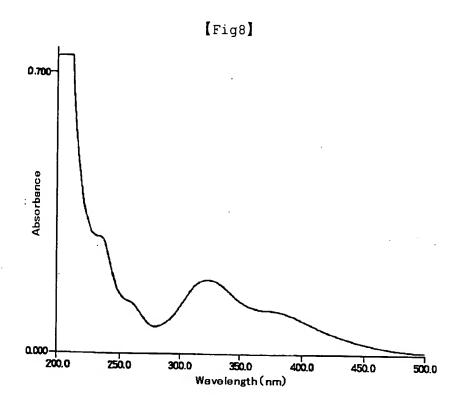


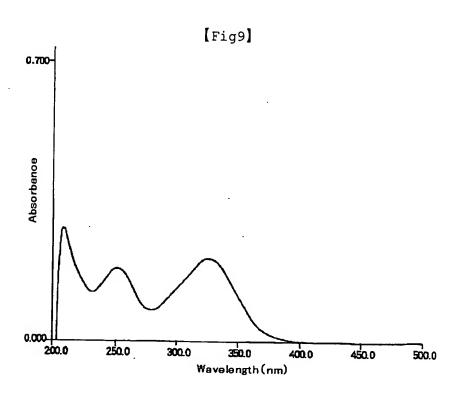


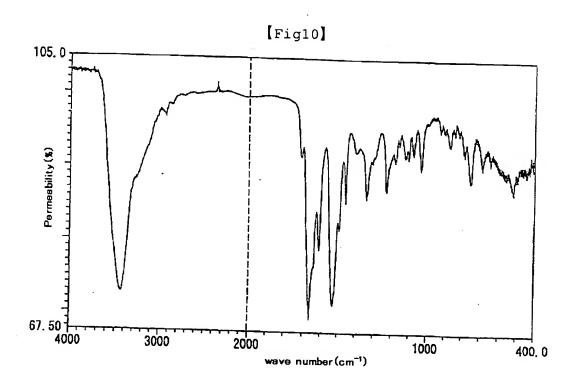


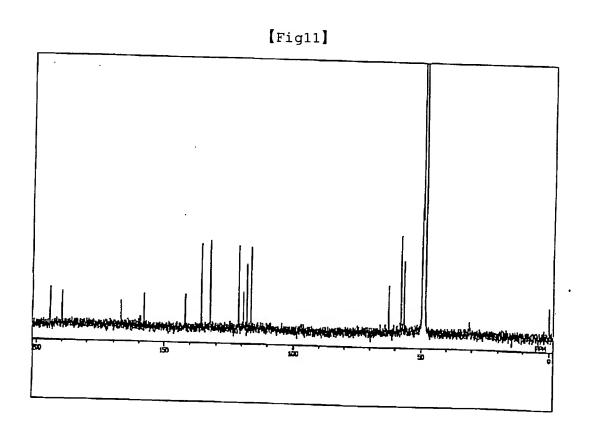


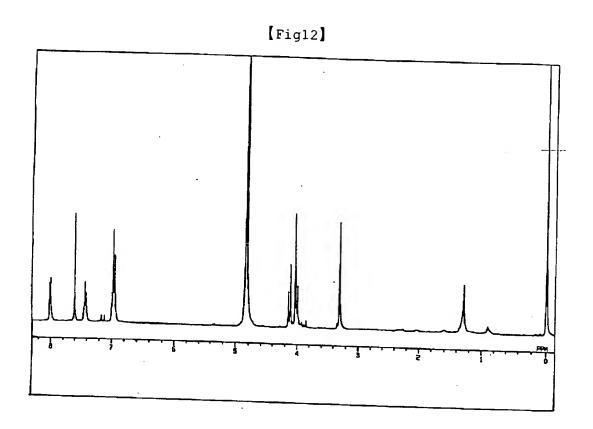












This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

M BLACK BORDERS
☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
☐ FADED TEXT OR DRAWING
☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
OTHER.

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.